



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschrift

(10) DE 196 28 894 A 1

(51) Int. Cl. 6:
C 12 N 15/62
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/70
G 01 N 33/68

(21) Aktenzeichen: 196 28 894.0
(22) Anmeldetag: 17. 7. 96
(43) Offenlegungstag: 22. 1. 98

(71) Anmelder:
Hagenmaier, Hanspaul, Prof. Dr., 72072 Tübingen, DE
(74) Vertreter:
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

(72) Erfinder:
Hagenmaier, Susanne, Dr., 72072 Tübingen, DE;
Hagenmaier, Hanspaul, Prof. Dr., 72072 Tübingen,
DE; Schrenk, Dieter, Dr. Dr., 72074 Tübingen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Verfahren zum Nachweis für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen
(57) Die Erfindung betrifft ein genetisches Verfahren zum Nachweis von Effektoren von protein-Protein-Wechselwirkungen, Verfahren zur Isolierung neuer Effektoren, Nukleinsäure-Sequenzen, welche für die im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren verwendeten Hybridproteine kodieren, sowie einen Analyserkit zur Durchführung des Nachweisverfahrens.

DE 196 28 894 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11.97 702 064/261

26/25

DE 196 28 894 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein genetisches Nachweisverfahren für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es ist insbesondere anwendbar im Rahmen des sogenannten Belastungs-Screenings für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren ist auch einsetzbar bei der Suche nach und Isolierung von unbekannten Effektoren bereits bekannter intra- und/oder interzellulärer Wechselwirkungen auf Proteinebene. Gegenstand der Erfindung sind außerdem Nukleinsäuresequenzen und Analysen-Kits, welche zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens benötigt werden.

Aus dem Stand der Technik ist seit langem bekannt, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen und die dabei gebildeten stabilen oder transienten Proteinkomplexe von entscheidender Bedeutung in der gesamten Biosphäre sind. Entstehung, Entwicklung und Reproduktion von Organismen der unterschiedlichsten Entwicklungsstufen wäre ohne Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht denkbar. Protein-Protein-Wechselwirkungen stellen in biochemischen Prozessen, wie DNA-Replikation, -Transkription und -Translation, sekretorischen Vorgängen, Signaltransduktion, Zellstoffwechsel und Zellzyklus, zentrale Schnitte dar.

Diese Schlüsselfunktion von Protein-Protein-Wechselwirkungen bringt es mit sich, daß Effektoren, welche, meist hoch spezifisch, eine bestimmte Wechselwirkung fördern oder inhibieren, einen wesentlichen Einfluß auf den betreffenden Organismus auszuüben vermögen.

Die Beeinflussbarkeit von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Effektoren kann z. B. anhand des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen erläutert werden. Das Cytoskelett trägt nicht nur zur Stabilität eukaryotischer Zellen bei, sondern übernimmt auch andere wichtige Funktionen, wie den Transport von Vesikeln, Veränderungen der Zellform sowie die Bewegung von Zellen. Diese dynamische Struktur wird durch drei Klassen filamentöser Zusammenlagerungen gebildet: den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Mikrofilamente werden durch Polymerisation eines Proteins, des sogenannten Aktins gebildet. Die für die Polymerisation erforderliche Protein-Protein-Wechselwirkung von Aktinproteinen kann beispielsweise durch das Pilz-Alkaloid Cytochalasin B inhibiert werden. Cytochalasin stört den Zusammenbau der Aktinfilamente durch die Bindung (Capping) an das für die weitere Polymerisation wichtige freie Ende des letzten Aktinproteins.

Ein Verständnis des Zusammenspiels der an einer Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Protein-Faktoren einerseits und der positiven oder negativen Effektoren andererseits ermöglicht die Nutzung dieser Erkenntnis in verschiedener Hinsicht. Versteht man nämlich, wie eine Protein-Protein-Wechselwirkung unter normalen Umständen, das heißt physiologisch verläuft, oder hat man physiologische Effektoren der Wechselwirkung analysiert, so besteht die Möglichkeit, diese Wechselwirkung gezielt zu manipulieren. Diese Manipulation kann darin bestehen, bekannte Effektoren durch gezielt modifizierte Effektoren zu ersetzen oder erstmals Effektoren für eine bekannte Protein-Protein-Wechselwirkung bereitzustellen. Darüber hinaus eröffnet ein Verständnis der Protein-Protein-Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen die Möglichkeit, Störungen des Organismus durch äußere Einflüsse zu verstehen und diesen gegebenenfalls vorzubeugen.

Eine Umsetzung der grundlegenden Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Proteinen auf zellulärer Ebene in praktischen Nutzen wird bisher dadurch behindert, daß die damit verbundenen Untersuchungen hohen zeitlichen und/oder experimentellen Aufwand erfordern. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Notwendigkeit besteht, Effektoren einer bekannten Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen. Handelt es sich beispielsweise um künstlich erzeugte Effektoren, wie zum Beispiel Umweltschadstoffe, welche bereits in geringsten Mengen eine physiologische Protein-Protein-Wechselwirkung beeinflussen und in der Folge einen Organismus schädigen können, besteht hierbei das Problem, den künstlichen Effektor zunächst einmal um mehrere Zehnerpotenzen anzureichern, um ihn dann chromatographisch, spektrometrisch oder enzymatisch nachweisen zu können. Ein klassisches Beispiel für einen derartigen Effektor stellt Dioxin, das heißt 2,3,7,8-Tetrachlordibenz-p-dioxin (TCDD) dar. Es ist mittlerweile bekannt, daß TCDD und andere Dioxine auf molekularer Ebene wirksame Induktoren der Transkription einer Reihe von Target-Genen darstellen, die für metabolische Enzyme, wie zum Beispiel Glutathion-S-Transferase Ya, Aldehyd-Dehydrogenase und Chinon-Oxidoreduktase kodieren (Landers, J.P. und Bunce, N. J. (1991) Biochem. J. 276, 273 bis 287). Mittlerweile ist auch bekannt, daß diese Dioxineffekte über den sogenannten intrazellulären Dioxinrezeptor, den sogenannten Ah (Arylhydrocarbon)-Rezeptor verlaufen. Es wurde festgestellt, daß dieser Rezeptor unter dem Einfluß von Dioxin an einen zweiten Proteinfaktor, das sogenannte Arnt-Protein bindet. Der auf diese Weise gebildete Komplex gelangt dann in den Zellkern, bindet an die Target-DNA und induziert auf diese Weise die oben beschriebene Transkription verschiedener weiterer biologischer Faktoren (vgl. Whitelaw, M. et al. (1993) Molecular and Cellular Biology, 2504 bis 2514; Mason, G.G.F., et al. (1994), J. Biol. Chem. Band 269, Nr. 6, 4438 bis 4449). Gerade auf dem Gebiet der Untersuchung von Umweltschadstoffen besteht ein großer Bedarf an geeigneten Screening-Methoden, um im Rahmen von dringend erforderlichen epidemiologischen Studien die Umweltbelastung, an weit größeren Populationen als bisher, im Rahmen eines sogenannten Belastungs-Screenings durchführen zu können.

Die potentielle Nutzbarkeit von Erkenntnissen über Effektoren spezieller Protein-Protein-Wechselwirkungen kann anhand einiger Beispiele aus dem Gebiet der Virologie weiter veranschaulicht werden. Viren sind bekanntlich Krankheitserreger für Mensch, Tier und Pflanzen. Sie können relativ harmlose Erkrankungen, wie Erkältungen, aber auch lebensbedrohliche Krankheiten, wie Polio oder AIDS, verursachen. Ein Virus ist ein intrazellulärer Parasit, der innerhalb und außerhalb einer Zelle in zwei fundamental unterschiedlichen Formen existieren kann. Die extrazelluläre Form wird Virion oder Viruspartikel genannt. Virione bestehen aus dem viralen Genom, welches mit Proteinen und zuweilen auch mit anderen chemischen Substanzen, wie Lipiden, assoziiert ist. Die Proteine schützen das Genom vor Zerstörung im extrazellulären Raum, ermöglichen den Eintritt in die Wirtszell und üben oftmals einleitende Schritte beim viralen Replikationszyklus aus. Während der Infektion wird die Virionstruktur größtenteils oder komplett zerstört, so daß das Genom in der Zelle frei zur Transkription und

Replikation vorliegt.

Auf den ersten Blick erscheinen Virione von tierischen Viren eine hohe Variabilität zu besitzen. Bei näherer Betrachtung sind jedoch wesentliche Gemeinsamkeiten erkennbar. Der Teil des Viruspartikels, welcher von Virus-kodierenden Proteinen aufgebaut wird, das Capsid, muß aus einem oder wenigen verschiedenen, sich wiederholenden Proteinbausteinen aufgebaut sein. Diese Beschränkung ist dem Virus durch die limitierte Größe seines Genoms vorgegeben und führt dazu, daß die Virion-Capside einen Grundbauplan mit folgenden zwei Eigenschaften besitzen: a) eine enge Helix undefinierter Länge mit dem Genom im Zentrum und b) eine quasi-sphärische ikosaedrische Struktur. Virione tierischer Viren können sich durch An- bzw. Abwesenheit eines äußeren Membranmantels zusätzlich unterscheiden. Virione, welche diese Membranhülle nicht besitzen, werden als "nackt" bezeichnet. Viren, die diesen, auch Envelope genannten, Membranmantel aufweisen, erwerben diesen aus der Membran des Wirts über einen 2-Schritt-Prozeß, der "budding" genannt wird. Zunächst werden virale Glykoproteine in die Membran insertiert, welche durch Wechselwirkung mit Capsid-Proteinen das Capsid mit der Membran umhüllen und das nun fertige Viruspartikel nach außen freisetzen.

Es zeigt sich also, daß bei viralen Prozessen Protein-Protein-Wechselwirkungen eine entscheidende Funktion besitzen: Es assoziieren Capsid-Proteine unter gegenseitiger Wechselwirkung zum Capsid; während des "budding"-Prozesses wechselwirken virale Glykoproteine aus der Membran der infizierten Zelle mit viralen Capsid-proteinen; Virion-Proteine wechselwirken mit Zelloberflächenantigenen der zu infizierenden Wirtszelle.

Dieses Wissen über zentrale Schlüsselereignisse könnten dazu dienen, Viren auf eben dieser Basis zu bekämpfen, indem man nämlich diese wichtigen Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Inhibitoren gezielt unterbindet. Die modernen Methoden der Molekularbiologie machen es möglich, die cDNA- bzw. Proteinsequenz viraler Proteine aufzuklären. Bisher fehlt es jedoch an geeigneten Testverfahren, um systematisch und mit vertretbarem experimentellem Aufwand nach geeigneten Effektoren dieser viralen Protein-Protein-Wechselwirkungen suchen zu können. Ein schnelles, nachweisempfindliches in-vivo-Screeningverfahren, für diesen Zweck wäre äußerst wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik ist seit einigen Jahren die sogenannte Two-Hybrid-Technik bekannt, welche auf Arbeiten von Fields, S. und Song, O., veröffentlicht in Nature (1989), 340, S. 245 bis 246, zurückgeht. Die Two-Hybrid-Technik wurde entwickelt, um Wechselwirkungen zwischen bekannten Proteinen besser untersuchen zu können oder um bisher unbekannte Proteine zu identifizieren, welche mit einem bestimmten bekannten Protein in Wechselwirkung treten.

Die Two-Hybrid-Technik ist eine genetische Methode, mit welcher eine Protein-Protein-Wechselwirkung über die transkriptionale Aktivität eines in Zellkultur produzierten Hybridprotein-Komplexes bestimmt wird. Die Technik beruht auf dem modularen Aufbau vieler ortsspezifischer Transkriptionsfaktoren (Transkriptionsaktivatoren), bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne. Die Two-Hybrid-Technik basiert auf der Beobachtung, daß eine direkte kovalente Verbindung zwischen diesen beiden Domänen nicht erforderlich ist, sondern daß eine räumliche Nähe, bewirkt durch Wechselwirkung zweier beliebiger anderer Proteine, ausreicht, um Transkription zu induzieren.

Zur Durchführung des Verfahrens ist es erforderlich, zwei Hybridproteine zu konstruieren und diese in einem geeigneten Wirtszellsystem, wie z. B. in Hefezellen, gemeinsam zu exprimieren. Eine Sequenz, die für ein erstes an einer Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Protein kodiert, wird unter Beibehaltung des Leserahmens mit der kodierenden Sequenz der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors, wie z. B. des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, fusioniert, wobei man die kodierende Sequenz für ein erstes Hybridprotein erhält. Die kodierende Sequenz für ein zweites Hybridprotein stellt man her, indem man die kodierende Sequenz für das zweite an der Wechselwirkung beteiligte Protein mit der kodierenden Sequenz für die Aktivator-Domäne des Transkriptionsfaktors im gleichen Leserahmen fusioniert. Ein funktionaler Aktivator wird nach Co-Expression in dem Wirtssystem erzeugt, wenn DNA-Bindungsdomäne und Aktivierungs-Domäne aufgrund der physikalischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Fremd-Proteinkomponenten miteinander in räumliche Nähe treten. Ist dies der Fall, so wird ein Reportergen exprimiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromauwärts gelegenen Aktivierungssequenz, wie zum Beispiel GAL1 UAS steht, an welche die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors bindet. Die durch die Wechselwirkung der beiden Fremdproteine bedingte Rekonstitution der Funktion des Transkriptionsfaktors bewirkt somit die Transkription des Reportergens (wie zum Beispiel lac Z oder HIS 3). Dessen Genprodukt, wie zum Beispiel β-Galactosidase, kann dann in herkömmlicher Weise nachgewiesen werden.

Die eben beschriebene Two-Hybrid-Technik wurde bisher ausschließlich bei der Identifizierung und Untersuchung verschiedener Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgreich eingesetzt. Staudinger et al. beschreiben in J. Biol. Chem. (1993), Bd. 268, S. 4608 bis 4611 die Verwendung der GAL4-Two-Hybrid-Technik zum Screening auf neue Zelltyp-spezifische Bindungspartner für das Helix-Loop-Helix (HLH)-Protein E12. Vojtek, A.B. et al. beschreiben in Cell (1993), Bd. 74, S. 205 bis 214 die Identifikation neuer, mit H-Ras wechselwirkenden Proteinen unter Verwendung der Two-Hybrid-Technik, wobei eine Maus-cDNA-Genbank gescreent wurde. Yang, X. et al. schlagen in Science (1992), Bd. 257, S. 680 bis 682 die Verwendung der Two-Hybrid-Technik zum Nachweis physikalischer Wechselwirkungen zwischen Protein-Kinasen und funktionell verwandten Substrat-Proteinen vor. Li, B. und Fields, S. berichten in The FASEB Journal (1993) Bd. 7, S. 957 bis 963 über Untersuchungen des Einflusses von Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53 auf dessen Wechselwirkung mit dem T-Antigen, einem viralen Oncogenprodukt aus SV 40. Chardin, P. et al. berichten in Science (1993), Bd. 260, S. 1338 bis 1343 über die Verwendung der Two-Hybrid-Technik zum Nachweis der Wechselwirkung des Proteins hSos1 mit dem Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenen Protein 2 (GRB2). Hardy, C. F. J. et al. beschreiben in Jens & Development (1992) Bd. 6, S. 801 bis 814 eine Mutante des Proteins RIF 1, welche mit einer Mutante des Sequenz-spezifischen DNA-Bindungsprot ins RAP 1 wechselwirkt. Der oben beschriebene Stand der Technik benutzt somit die Two-Hybrid-Technik ausschließlich in der von Fields und Song bereits 1989 vorgeschlagenen Art und Weise,

nämlich zum Screening einer DNA-Genbank um neue Protein-Bindungspartner eines bereits bekannten Proteins ausfindig zu machen, und um bekannte Protein-Protein-Bindung näher zu charakterisieren.

Als weitere Anwendungsmöglichkeit wurde von Fiels und Song (1989, a.a.O.) die Anwendung der Two-Hybrid-Technik im Rahmen des Designs therapeutisch wirksamer Peptide vorgeschlagen, die mit Proteinen bakteriellen oder viralen Ursprungs wechselwirken. Ausführungsbeispiele zu ihren Vorschlag liefern die Autoren jedoch nicht.

Eine gewisse Erweiterung des klassischen Anwendungsgebietes der Two-Hybrid-Technik stellen die Arbeiten von Luban et al. sowie von Chiu et al. dar. Luban, J. et al. beschreiben in Cell, (1993) Bd. 73, S. 1068 bis 1078 die Verwendung des GAL4-Two-Hybrid-Systems zum Screening einer cDNA-Bank und die Identifikation von Cyclophilin A und B als Proteine, die mit dem Gag Polyprotein Pr55^{gag} aus HIV-1 wechselwirken. Es wurde weiterhin festgestellt, daß die Gag-Cyclophilin A Wechselwirkung durch Cyclosporin A unterbunden werden kann, wobei jedoch bereits aus früheren Arbeiten bekannt war, daß Cyclosporin A an Cyclophilin bindet.

Chiu, M.I. et al. beschreiben in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), Bd. 91, S. 12574 bis 12578 die Suche nach einem Bindungsprotein, das mit dem FKBP12/Rapamycin-Komplex wechselwirkt. Rapamycin ist ein bekanntes Immunsuppressivum, das mit seinem Rezeptorprotein FKBP12 einen Komplex bildet, der, wie von Chiu et al. festgestellt, an ein weiteres bis dahin nicht bekannte Protein, nämlich RAPT 1 bindet. Die Arbeiten von Luban et al. bzw. Chiu et al. haben somit gezeigt, daß die Two-Hybrid-Technik auch zum Nachweis solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden kann, welche in Gegenwart eines bekannten niedermolekularen Liganden unterbunden werden (wie z. B. im Falle von Cyclosporin A) oder erst in Gegenwart des Liganden beobachtet werden können (wie im Falle von Rapamycin). Beiden Arbeiten gemeinsam ist jedoch die Suche nach einem bisher nicht bekannten Protein-Bindungspartner. Ohne konkrete Beispiele zu liefern, spekulieren Chiu et al. daß die Two-Hybrid-Technik für Tests mit und das Design von niedermolekularen Modulatoren einer Protein-Protein-Wechselwirkung eingesetzt werden könnte, wobei die untersuchten Modulatoren potentiellen therapeutischen Wert besitzen sollten. Voraussetzung für solche Untersuchungen wäre jedoch, den zu testenden Modulator in isolierter Form, d. h. als Reinsubstanz und vor allem in ausreichender Menge, zur Verfügung zu haben, um ihn dann zur Untersuchung seines Einflusses auf die Protein-Protein-Wechselwirkung im Test einzusetzen zu können.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, daß der diskutierte Stand der Technik keinerlei brauchbare Hinweise enthält, daß die Two-Hybrid-Technik erfolgreich bei der Suche nach niedermolekularen, bekannten oder unbekannten Effektoren definierter Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden kann. Insbesondere gibt es keinen Hinweis im Stand der Technik, die Two-Hybrid-Technik im Rahmen echter Screeningverfahren für niedermolekulare Effektoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen einzusetzen. Screeningverfahren sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, daß der potentielle Effektor nicht als Reinsubstanz sondern im Gemisch mit anderen Verbindungen und in äußerst geringer Konzentration vorliegt. Dies ist insbesondere der Fall, wenn man neue Ressourcen auf unbekannte Effektoren hin untersucht oder in identischer Weise gewonnene Proben gleichen Typs auf einen bekannten Effektor screenet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist somit die Bereitstellung eines Nachweisverfahrens für niedermolekulare Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dessen Hilfe insbesondere Substanzgemische schnell und mit hoher Nachweisempfindlichkeit auf das Vorhandensein eines bekannten oder unbekannten Effektors für ein vorgegebenes Protein-Protein-Wechselwirkungssystem untersucht werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren soll insbesondere anwendbar sein für sogenannte Belastungsscreeningsverfahren, die im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen eingesetzt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren soll außerdem geeignet sein zur Durchführung sogenannter Naturstoffscreeningsverfahren, um neuartige therapeutische Wirksubstanzen lokalisieren und anschließend analysieren zu können.

Überraschenderweise gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch Bereitstellung eines genetischen Nachweisverfahrens für Effektoren intra- und/oder intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

- a) in einer Wirtszelle in Gegenwart eines Analyten, in dem man die Effektorfunktion vermutet, zwei Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ exprimiert, deren Domänen A₁ und B₁ zusammen einen funktionellen Transkriptions-Aktivator-Komplex bilden, wenn die Domänen A₂ und B₂, welche die intra- und/oder interzelluläre Wechselwirkung, so wie sie beispielsweise unter physiologischen Bedingungen abläuft, imitieren, miteinander wechselwirken, wobei die Wechselwirkung zwischen den Polypeptiddomänen A₂ und B₂ nur bei Fehlen oder Vorliegen der Effektorfunktion, d. h. wenigstens eines Effektors, in dem Analyten zu beobachten ist; und
- b) auf Expression eines Reporter-Gens analysiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche der (in situ gebildete) Transkriptions-Aktivator-Komplex bindet, wobei Expression des Reportergen-Produkts auf Vorliegen oder Fehlen der Effektorfunktion im Analyten hinweist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung der auf diese Weise nachgewiesenen Effektoren sowie die unter Anwendung dieses Verfahrens isolierten neuen Effektoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Nukleinsäuresequenzen, welche für die im erfindungsgemäßen Nachweisverfahren verwendete Hybridprotein oder Polypeptidhybride A₁A₂ und B₁B₂ kodieren.

Schließlich ist Gegenstand der Erfindung ein Analysenkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt das Konstruktionsschema zweier erfundungsgemäß anwendbarer Expressionsvektoren vor Insertion der kodierenden Sequenz für die zweite Hybridprotein-Komponente: (A) zeigt das 5523 bp Plasmid pGBT9, das die kodierende Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne (bd) des eukaryotischen Transkriptionsaktivators GAL4 enthält. (B) zeigt das 6659 bp Plasmid pGAD424, das die kodierende Sequenz für die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (ad) von GAL4 enthält. In den Fig. 1(A) und 1(B) steht "MSC" für die Multiple Klonierungsstelle, "p" für die Promotor, "T" für die Transkriptions-Terminationssequenz und "▲" für das SV40 Kernlokalisierungssignal.

Fig. 2 zeigt das Konstruktionsschema der Expressionsvektoren von Fig. 1 nach Insertion der kodierenden Sequenz für die zweite Hybridprotein-Komponente: (A) veranschaulicht die Insertion der kodierenden Sequenz für das ARNT-Protein in die BamHI-Schnittstelle der MSC von pGBT9. (B) zeigt die Insertion der kodierenden Sequenz für das Ah-Protein in die Sall Schnittstelle der MSC von pGAD424.

Die Erfindung wird in den nun folgenden Abschnitten näher erläutert.

Das erfundungsgemäße Nachweisverfahren bietet den überraschenden Vorteil, daß Effektoren einer vorgegebenen Protein-Protein-Wechselwirkung in effizienter Weise, das heißt schnell und, in der Regel ohne Abtrennung der in dem untersuchten Analyten vorhandenen weiteren nieder- oder hochmolekularen Komponenten qualitativ erfaßt werden können. Eine Auf trennung des Analyten bzw. eine weitere Eingrenzung des Effektors ist nur dann angesagt, wenn sich zeigen sollte, daß mehr als ein Effektor der betreffenden Protein-Protein-Wechselwirkung in dem Analyten enthalten ist oder einzelne Komponenten der Analyten das Testsystem stören. Letzteres kann der Fachmann durch wenige Kontrollversuche leicht feststellen.

Die im erfundungsgemäßen Testsystem künstlich induzierte Protein-Protein-Wechselwirkung "imitiert" die natürliche, bzw. physiologische Wechselwirkung insofern, als zumindest die Bindungsspezifität der wechselwirkenden Proteinkomponenten im wesentlichen erhalten bleibt. Die Stärke der Wechselwirkung im Testsystem kann im Vergleich zum physiologischen Prozeß variieren.

Die gemäß vorliegender Erfindung vorgegebene Protein-Protein-Wechselwirkung ist natürlich nicht beschränkt auf reine Proteine oder Polypeptide. Die Erfindung ist ebenfalls anwendbar auf solche Wechselwirkungen, an denen z. B. Glykoproteine oder Lipoproteine beteiligt sind. Erfundungsgemäß brauchbare Testsysteme sind außerdem nicht nur mit vollständigen Proteinen als Bindungspartner etablierbar. Vielmehr sind auch funktionale Äquivalente von an der nativen Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten Faktoren brauchbar. Solche funktionalen Fragmente können Teilesequenzen, wie z. B. bestimmte Domänen, des Faktors umfassen, auf welche die zur Wechselwirkung benötigte Bindungsfunktion lokalisiert ist. Geeignete Fragmente können z. B. gentechnisch oder in klassischer Weise durch enzymatische oder chemische Fragmentierung erzeugt werden. Erfundungsgemäß funktionelle Äquivalente umfassen außerdem durch Aminosäure-Substitution, -Addition und/oder -Deletion unter Beibehaltung der Bindungsspezifität, z. B. gentechnisch, erzeugte Derivate der Bindungspartner.

Der nachzuweisende Effektor ist vorzugsweise eine niedermolekulare Komponente, welche die Protein-Protein-Wechselwirkung stimuliert oder inhibiert. Es kann sich also um einen positiven oder negativen Effektor der Wechselwirkung handeln.

Die vorgegebene intra- und/oder interzelluläre Protein-Protein-Wechselwirkung ist ein Vorgang, der unter physiologischen Bedingungen in prokaryotischen, wie z. B. bakteriellen Zellsystemen, in eukaryotischen Zellen, wie z. B. Hefezellen oder menschlichen Zellen, oder in viralen Mikroorganismen oder bei der Wechselwirkung verschiedener dieser Zellsysteme untereinander, wie z. B. eine Wechselwirkung viralen Proteine mit eukaryotischen Proteinen, abläuft. Durch geeignete Wahl des Testsystems, insbesondere der zu transformierenden Wirtszellen, kann die Protein-Protein-Wechselwirkung unter möglichst physiologischen Bedingungen nachgeahmt werden.

Es sind unterschiedliche Arten von Protein-Protein-Wechselwirkungen anwendbar. Ein erster Typ betrifft Wechselwirkungen, die nur dann zustande kommen, wenn ein Effektor im Analyten anwesend ist. Ein positiver Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung ist somit gleichbedeutend mit einem positiven Effektor-Nachweis. Ein zweiter Typ betrifft Wechselwirkungen, die in Gegenwart eines Effektors unterbunden werden. Ein positiver Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung ist dann gleichbedeutend mit einem negativen Effektor-Nachweis.

Das erfundungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise so durchgeführt, daß man ein geeignetes prokaryotisches oder eukaryotisches Wirtszellsystem mit einer ersten und einer zweiten Nukleinsäure-Sequenz transformiert, wobei die erste Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid A₁A₂ kodiert, welches die Transkriptions-Aktivierungsdomäne A₁ des Transkriptionsfaktors, wie z. B. Gal4, und die Polypeptid-Domäne A₂ umfaßt; und die zweite Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid B₁B₂ kodiert, welches die DNA-Bindungsdomäne B₁ eines Transkriptionsfaktors, wie z. B. GAL4, und die Polypeptid-Domäne B₂ umfaßt.

Der durch Wechselwirkung die Hybridprotein-Domänen A₂ und B₂ induzierte "funktionelle Transkriptionsaktivatorkomplex" (A₁A₂/B₁B₂) entspricht hinsichtlich seiner Funktion im wesentlichen dem nativen Transkriptionsaktivator, von dem die Hybridprotein-Domänen A₁ und B₁ abgeleitet sind. Ebenfalls anwendbar sind funktionelle Äquivalente dieser Domänen, die man durch Aminosäure-Addition, -Deletion und/oder -Substitution unter Beibehaltung der charakteristischen Eigenschaften, wie Bindungsspezifität und Aktivierungsspezifität, gentechnisch oder in anderer Weise, herstellen kann.

Der erfundungsgemäß zu untersuchende Analyt ist vorzugsweise ein Gemisch von Substanzen, wobei man vermutet, daß wenigstens eine dieser Substanz einen positiven oder negativen Einfluß auf die vorgegebene Protein-Protein-Wechselwirkung ausübt. Insbesondere bevorzugt ist diese wirksame Substanz eine niedermolekulare anorganische, vorzugsweise organische Verbindung.

Der erfindungsgemäß untersuchte Analyt ist beispielsweise ausgewählt unter Körperflüssigkeitsproben, wie z. B. Gesamtblut, Muttermilch, Liquor, Speichel und Urin. Außerdem sind mit dem erfindungsgemäßem Verfahren Extrakte oder Homogenate prokariotischer oder eukariotischer Zellen, wie z. B. bakterielle Homogenate, Homogenate aus Pflanzenzellen oder Homogenate aus niederen Eukaryoten, wie zum Beispiel Hefen, oder höheren Eukaryoten, wie zum Beispiel tierischen oder menschlichen Zellen untersuchbar. Bevor man die oben beschriebenen Analyten im erfindungsgemäßem Verfahren einsetzt, kann es von Vorteil sein, höhermolekulare Komponenten, wie z. B. Zellfragmente, Organellen, oder Makromoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, abzutrennen.

Erfindungsgemäß untersuchbar sind ebenfalls umweltanalytische Proben, wie z. B. Wasser-, Luft- und Bodenproben, Rückstände aus Industrieanlagen, wie z. B. flüssiger oder fester Sondermüll, Filterstäube aus Rauchgasfilteranlagen. Außerdem sind erfundungsgemäß analysierbar Lebensmittelproben. Auch für die Untersuchung von Bodenproben, Rückständen aus Industrieanlagen sowie Lebensmittelproben ist es zweckmäßig, vor der Untersuchung einen geeigneten Extrakt herzustellen.

Schließlich besteht die Möglichkeit mit Hilfe des erfundungsgemäßem Verfahrens Reaktionsgemische chemischer Synthesen, gegebenenfalls nach geeigneter Aufbereitung, wie z. B. Austausch von Lösungsmittel, Aufkonzentrieren oder Verdünnen, auf Effektorfunktion zu untersuchen.

Mit dem erfundungsgemäßem Verfahren sind insbesondere Effektoren zellphysiologischer Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachweisbar, die in oder zwischen eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen, in Viruspartikeln oder zwischen Viruspartikeln und eukaryotischen Zellen ablaufen. Bei dem Effektor dieser Wechselwirkung kann es sich prinzipiell um eine wohl charakterisierte, bekannte Substanz oder um eine bisher in der Fachwelt nicht beschriebene Substanz handeln.

Als Beispiel für einen Effektor der einen zellphysiologischen Prozeß beeinflußt, welcher in eukaryotischen Zellen abläuft, kann 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) genannt werden. Das zelluläre Dioxin-Rezeptor-System stellt ein typisches Beispiel für eine Signal-kontrollierte Dimerisierung von basischen Helix-Loup-Helix (bHLH)-Faktoren dar. Der Ablauf der durch Dioxin vermittelten zellulären Signaltransduktion läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Vor der Bindung eines Dioxinmoleküls setzt sich das zytosolische Rezeptormolekül aus drei Untereinheiten zusammen: dem Dioxin-bindenden Ah-Rezeptor und zwei Molekülen des 90 kDa-Hitzeschockproteins HSP90. Den HSP90-Untereinheiten kommt dabei die Funktion zu, den Ah-Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden in einem inaktiven Zustand zu halten. Nach Bindung eines Dioxin-Moleküls an den Ah-Rezeptor dissoziieren die beiden HSP90-Moleküle vom Ah-Rezeptor ab, wodurch dieser aktiviert und zur Bindung an das sogenannte Arnt-Protein befähigt wird. Der so gebildete Dioxin-beladene Komplex ist dann zur Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern befähigt. Wie die Deletionsversuche zeigten, erfolgt die Proteindiinnerisierung über Wechselwirkung der beiden basischen Helix-Loup-Helix-Domänen im Ah-Rezeptor und im Arnt-Protein. Der Dioxin-beladene heterodimäre Rezeptorkomplex erkennt eine spezifische DNA-Sequenz, nämlich das sogenannte Xenobiotic Responsible Element (XRE). Die Bindung an das XRE führt zur Induktion einer Reihe von Zielgenen, u. a. des Gens für das Enzym Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) das am Metabolismus polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt ist. Die durch die Metabolisierung polychlorierten polycyclischen Aromaten, wie TCDD, ausgelösten Pathomechanismen, die z. B. zu Immunsuppression oder Tumorpromotion führen können, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es bietet sich nunmehr an, ein Two-Hybrid-Testsystem des oben beschriebenen allgemeinen Typs zu etablieren, worin man als erste Hybridproteindomäne A₂ den Ah-Rezeptor oder ein Bindungsfragment davon verwendet und als zweite Hybridproteindomäne B₂ entweder HSP 90 oder das Arnt-Protein oder ein bindendes Fragment eines der beiden Faktoren verwendet. Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen des Ah-Rezeptors, des HSP 90 sowie des Arnt-Proteins sind aus dem Stand der Technik bekannt, so daß die zur Durchführung des Tests erforderlichen Nukleinsäuresequenzen für die Herstellung der beiden Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ leicht zur Verfügung gestellt werden können.

Für den Dioxinnachweis mit Hilfe der Two-Hybrid-Technik sind somit grundsätzlich zwei verschiedene Testsysteme denkbar. Im ersten Fall, das heißt bei Verwendung von HSP 90 und dem Ah-Rezeptor als Bindungspartner, wird durch die Bindung des Dioxin-Moleküls an den Ah-Rezeptor eine Protein-Protein-Wechselwirkung aufgehoben, was zur Folge hat, daß im Two-Hybrid-Test die Expression des Reporter-Gens unterbunden wird. Im zweiten Fall, das heißt bei Verwendung von Arnt-Protein und Ah-Rezeptor als Bindungspartner, wird durch die Bindung des Dioxinmoleküls an den Ah-Rezeptor eine Protein-Protein-Wechselwirkung aufgebaut, so daß im Two-Hybrid-Test die Expression eines Reporter-Gens nachgewiesen werden kann. Für die Durchführung des Dioxinnachweises bietet es sich an, auf Two-Hybrid-Testsysteme zurückzugreifen, welche für Protein-Protein-Bindungstests bereits etabliert wurden. So wird beispielsweise unter der Handelsbezeichnung MATCHMAKER Two-Hybrid-System von der Firma Clontech Laboratories Inc., Paolo Alto, USA, ein geeignetes Testsystem vertrieben. Auf die Angaben der Herstellerfirma, insbesondere auf das dem vertriebenen Testsystem beigefügten Versuchsprotokoll wird hiermit voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Durchführung des Dioxinnachweises unter Verwendung des MATCHMAKER-Systems läßt sich wie folgt zusammenfassen: Das System umfaßt zwei verschiedene Expressionsvektoren (pGBT9 und pGAD424), welche Gene für die DNA-Bindungsdomäne (pGBT9) bzw. für die Aktivierungsdomäne (pGAD424) des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 tragen.

Der pGBT-Vektor wird zur Herstellung einer ersten Nukleinsäuresequenz verwendet, welche für ein Hybrid aus Gal4-DNA-Bindungsdomäne und Arnt-Protein besteht. Um diesen Hybridvektor zu konstruieren wird eine PCR (Polymerase Chain Reaction) mit den spezifischen Oligonukleotiden H3 und H4 folgender Sequenz:

H3: 5'CGGGATCCCCGAAATGACATCAGATGT (SEQ ID NO:3)
H4: 5'CGGGATCCACCTGCTGGGCAGAAAAG (SEQ ID NO:4)

mit der Arnt-cDNA als Matrix durchgeführt. Die spezifischen Primer erlauben Amplifikation des Arnt-Leserasters mit BamHI-Schnittstellen an dessen 5'- und 3'-Ende. Über die BamHI-Schnittstellen erfolgt die Ligation mit dem BamHI-behandelten pGBT9-Vektor.

Der pGAD424-Expressionsvektor des Matchmaker-Systems wird verwendet zur Herstellung einer zweiten Nucleinsäuresequenz, welche für ein Hybrid aus GAL4-Aktivierungsdomäne und dem Ah-Rezeptor dient. Der Leseraster des Ah-Rezeptors wird ausgehend von der Ah-cDNA mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide H1 und H2

H1: 5'AGGTCGACACTCTGCACCTTGCTTAGGAAT (SEQ ID NO:1)

H2: 5'AGGTCGACTTATGAGCAGCGGCCAACAT (SEQ ID NO:2)

durch PCR amplifiziert. Diese Oligonucleotide versehen den Leseraster des Ah-Rezeptor mit Sall-Schnittstellen. Die auf diese Weise modifizierte Ah-Sequenz kann mit dem Sall-geschnittenen pGAD424-Vektor ligiert werden.

Die beiden auf diese Weise hergestellten Hybridvektoren pGBT9-Arnt und pGAD424-Ah werden zunächst in E. coli transformiert, vermehrt und gereinigt. Zeigen die isolierten Plasmide die gewünschten Konstrukte, werden pGBT9-Arnt und pGAD424-Ah in SFY526-Hefewirtszellen cotransformiert. Ist Dioxin im Wachstumsmedium anwesend, so ist eine Dimerisierung der beiden exprimierten Fusionsproteine die Folge. Die Dimerisierung der beiden GAL4-Domänen in den beiden Hybrid-Proteine führt zur Aktivierung der Transkription des Reportergens β-Galactosidase, dessen Bildung in üblicher Weise mittels Farbreaktion nachgewiesen wird. Die Nachweisempfindlichkeit für 2,3,7,8-TCDD liegt pro Ansatz im unteren Femtomol- bis oberem Atomol-Bereich und somit im Bereich der Nachweisgrenze der derzeit auf dem Markt erhältlichen empfindlichsten Massenspektrometer.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Nachweisverfahren für Effektoren viraler Protein-Protein-Wechselwirkungen bereitgestellt. Dieses kann in völliger Analogie zu dem oben beschriebenen Dioxintest durchgeführt werden. Insbesondere werden gemäß dieser Ausführungsform Wechselwirkungen zwischen den Poliovirus-Capsidproteinen VP1 und VP3 sowie zwischen zwei p18-Capsidproteinen bzw. zwei p24-Capsidproteinen aus HIV-1 getestet. Beispiele für die Zusammensetzung in einem die erfundungsgemäßem Verfahren zum Nachweis viraler Protein-Protein-Wechselwirkungen anwendbarer Hybrid-Konstrukte A₁A₂ und B₁B₂ sind in folgender Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

| Domäne | A ₁ | A ₂ | B ₁ | B ₂ |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Poliovirus | GAL4-BD | VP1 | GAL4-AD | VP3 |
| HIV 1 | GAL4-BD | p18 | GAL4-AD | p18 |
| HIV 1 | GAL4-BD | p24 | GAL4-AD | p24 |

A₁ = DNA-Bindungsdomäne

A₂ = erstes virales Zielprotein

B₁ = Aktivatordomäne

B₂ = zweites virales Zielprotein

BD = Bindungsdomäne

AD = Aktivatordomäne

VP1 und VP3 können in den obengenannten Hybriden auch gegeneinander vertauscht sein.

Wie oben für den Dioxin-Test beschrieben, können die kodierenden und mit geeigneten Restriktionsschnittstellen versehenen DNA-Sequenzen für die viralen Hybridproteinkomponenten A2 und B2 hergestellt und in die oben beschriebenen Vektoren pGBT9 bzw. pGAD424 insertiert werden. Die Durchführung des Two-Hybrid-Tests zum Nachweis eines Effektors der viralen Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgt dann in Analogie zum oben beschriebenen Dioxin-Test. Dieses Testsystem ist auch auf alle anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung viraler Proteine übertragbar.

Viren, welche neben dem Protein-capsid zusätzlich über einen Envelope mit Glykoproteinen verfügen, können ebenfalls als Grundlage für ein erfundungsgemäßes Verfahren verwendet werden. Die Glykoproteine des Envelopes wechselwirken bekanntlich mit den Capsidproteinen. Diese Wechselwirkung ist notwendig, um das Virus mit der Envelope-Struktur auszustatten und gleichzeitig aus der Zelle auszuschleusen. So zeigt beispielsweise der Semliki-Forest-Virus zwei Spike-Glykoproteine E1 und E2, die, wie viele andere virale Hüll-Glykoproteine,

aus drei Domänen bestehen: einer externen, einer Transmembran- und einer internen Domäne. Die interne, C-terminale Domäne tritt in Wechselwirkung mit den Capsid-Proteinen. Ein Two-Hybrid-Test zum Nachweis von Effektoren dieser Wechselwirkung kann in der Weise etabliert werden, daß man die kodierende Sequenz für das Capsid-Protein und das Envelope-Glycoprotein, oder bevorzugt die DNA-Sequenz wechselwirkender Fragmente dieser beiden Proteine in die oben beschriebenen Vektoren insertiert und die auf den Vektoren enthaltene genetische Information in Gegenwart eines Analyten exprimiert. Ein Two-Hybrid Verfahren zum Nachweis von Effektoren der Wechselwirkung zwischen viralen Capsiden und Envelope-Proteinen stellt somit eine weitere bevorzugte Ausführungsform dar.

Für den Fachmann wird aus obigen Ausführungen ersichtlich, daß die vorliegende Erfindung nicht auf die oben beschriebenen konkreten Ausführungsformen und die beiliegenden Beispiele beschränkt ist. Vielmehr können unter Anwendung des erfindungsgemäßen Testprinzips weitere Testsysteme etabliert werden, welche auf definierten Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung eukaryotischer, prokaryotischer, und/oder viraler Proteine beruhen. Die Erfindung ist außerdem nicht auf die Verwendung der oben beschriebenen konkreten Vektoren und Wirtszellen beschränkt, vielmehr sind auch alle anderen vergleichbaren Testsysteme, wie z. B. die bisher in der Fachliteratur beschriebenen Expressionsvektoren und Wirtszellen anwendbar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung neuer Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

- a) einen Analyten einem Nachweisverfahren gemäß obiger Definition unterzieht;
- b) bei positivem Nachweis einer Effektorfunktion in dem Analyten diese mit herkömmlichen präparativen Methoden, gegebenenfalls durch weitere Auf trennung des Analyten, eingrenzt und den Effektor, gegebenenfalls mit Hilfe des Nachweisverfahrens gemäß obiger Definition, oder in anderer Weise, wie z. B. durch Spektroskopie, Hochdrucksflüssigkeitschromatographie, Dünnschichtchromatographie, lokalisiert und mit herkömmlichen präparativen Methoden, wie z. B. Chromatographie, isoliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nucleinsäuresequenzen, welche für Polypeptid-Hybride kodieren, die Polypeptid-Domänen gemäß obiger Definition enthalten. Bevorzugte Beispiele für Nucleinsäuresequenzen sind die für die Polypeptid-Hybride GAL4-Bindungsdomäne/Arnt und GAL4-Aktivierungsdomäne/Ah kodierenden Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Analysenkit zur Durchführung eines der oben beschriebenen Nachweisverfahren. Der erfindungsgemäße Analysenkit ist dadurch gekennzeichnet, daß er in getrennten Kompartimenten

- a) einen ersten Transformationsvektor, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid A₁A₂,
- b) einen zweiten Transformationsvektor, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid B₁B₂ und gegebenenfalls
- c) eine Wirtszellkultur umfaßt, die die genetische Information für ein Reporter-Gen enthält, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche, nach Transformation der Wirtszelle mit dem ersten und dem zweiten Transformationsvektor der Transkriptions-Aktivator-Komplex A₁B₁ bindet, wenn die Hybridprotein-Domänen A₂ und B₂ in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Effektors miteinander wechselwirken.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden Ausführungsbeispiele, welche die Etablierung eines Dioxin-Screening-Systems betreffen, näher erläutert.

Beispiel 1

Bereitstellung eines Testsystems für den genetischen Dioxin-Nachweis

1. Herstellung der Plasmidkonstrukte pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt

1.1 Allgemeine Vorschrift für die Durchführung der Polymerase Chain Reaction (PCR)

Es wurden folgende Primer synthetisiert:

Oligonucleotid H1: 5'AGGTCGACACTCTGCACCTTGCTTAGGAAT
 Oligonucleotid H2: 5'AGGTCGACTTATGAGCAGCGGCCAACAT
 Oligonucleotid H3: 5'CGGGATCCCCGAAATGACATCAGATGT
 Oligonucleotid H4: 5'CGGGATCCACCTGCTGGGCAGAAAAG

Das PCR-Protokoll wurde in etwas veränderter Form entsprechend den Angaben von Perkin-Elmer-Cetus (Protokoll für DNA Amplifikation) durchgeführt. Für die Amplifikation eines DNA-Fragments mit Hilfe der PCR wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

| Reagenz | Volumen in μl | Konzentration |
|---------------------------|--------------------------|---------------|
| Taq-Polymerase | 0,5 | 2,5 U |
| dNTP Mix: 1,25 mM je dNTP | 16 | 0,2 mM |
| Primer 1 | 5 | 1 mM |
| Primer 2 | 5 | 1 mM |
| 10*Taq-Puffer | 10 | 1-fach |
| Plasmid-DNA | 1 | 10 ng |

5

10

15

20

25

30

Die Reaktion erfolgte in 100 μl Endvolumen in siliconisierten, autoklavierten Reaktionsgefäßen. Die PCR wurde im DNA Thermocycler 1 min bei 95°C, 3 min bei 60°C und 2,5 min bei 72°C durchgeführt. Der 72°C-Schritt wurde pro Zyklus um 2 s verlängert. Insgesamt umfaßte die PCR 30 Zyklen. Die PCR wurde mit einem "Hot start" (zu Beginn 5 min 95°C) gestartet und nach 10 min bei 72°C beendet.

1.2 Synthese der Plasmidkonstrukte pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt

1.2.1 Materialen

Die Plasmide pGAD424 und pGBT9 (Fig. 1 (A) und (B)) sind von der Firma Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA erhältlich. Ah-cDNA und Arnt-cDNA können in herkömmlicher Weise aus Ah- und Arnt-Protein exprimierenden Zellen isoliert werden.

Die cDNA Klonierung sowie DNA- und Aminosäuresequenz von murinen Ah-Protein werden beispielsweise beschrieben von Ema, M. et al., in Biochem. Biophys. Res. Communications (1992), Bd. 184, 246–253, auf dessen Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Das murine Ah-Protein stellt ein Polypeptid aus 805 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 90380 Dalton dar.

Die cDNA Klonierung des humanen Arnt-Proteins wird beispielsweise beschrieben von Hoffman, E.C. et al. in Science (1991), Bd. 252, 954–958, auf dessen Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Das humane Arnt Protein umfaßt 789 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 86637 Dalton.

Da die kodierenden DNA-Sequenzen außerdem aus dem Stand der Technik bekannt sind, können die zur Durchführung der folgenden Beispiele erforderlichen DNA-Moleküle auch auf synthetischem Weg bereitgestellt werden.

1.2.2 Allgemeine Vorschrift für Restriktionsverdau und Ligation zur Herstellung der Plasmidkonstrukte

45

Zu ca. 2 mg DNA in bidestilliertem Wasser wurden 2 ml Restriktionsenzympuffer (10×) und 10–20 U der betreffenden Restriktionsenzyme gegeben, mit bidestilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt, vorsichtig gemischt und bei 37°C 1–2 Stunden inkubiert. Die entsprechend behandelte DNA wurde auf einem 0,8% Agarose-TBE Gel aufgetrennt und mit dem QIAEX-Gel-Extraction-Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

50

Die Ligation der isolierten DNA-Fragmente erfolgte in 1 × Ligasepuffer in einem Volumen von maximal 20 μl mit 1 U T4-Ligase bei 16°C über Nacht. In der Regel lagen Vektor und Insert in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 3 vor.

55

1.2.3 Herstellung von pGAD424-Ah

60

Mit Hilfe der PCR-Methode wurde unter Verwendung der spezifischen Oligonucleotide H1 und H2, ausgehend von der Ah-cDNA-Matrix, die codierende Sequenz des Ah-Rezeptors amplifiziert. Die synthetischen Oligonucleotide wurden so konstruiert, daß in das amplifizierte Ah-Fragment am 3'- und 5'-Ende Sall Schnittstellen eingeführt wurden. Das gereinigte PCR-Ah-Fragment wurde einem Sall-Restriktionsverdau unterworfen und in den ebenfalls mit Sall geschnittenen pGAD424-Vektor ligiert (Fig. 2(B)). Die nach Transformation in den E. coli Stamm MC4100F' erhaltenen Klone (Selektion auf Amp-Resistenz) wurden hinsichtlich ihrer Plasmide untersucht. Anhand eines EcoRI Restriktionsverdaus konnte bestimmt werden, welche Bakterienklone das gewünschte Konstrukt pGAD424-Ah enthielten. Der entsprechende Bakterienklon wurde vermehrt und die Plasmid-pGAD424-Ah-DNA isoliert. Für die Plasmid-Isolierung aus transformierten E. coli Zellen wurde der QIAGEN-Plasmid-Kit in Kombination mit QIAGEN-Tip-200 Säulen verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmidisolierung wurde eine 150 ml Übernachtkultur

65

der transformierten E.coli Zellen verwendet. Die Plasmidausbeute einer Isolierung lag für Plasmid pGAD424-Ah zwischen 0,5 und 1 mg/ml.

1.2.4 Herstellung von pGBT9-Arnt

Mit Hilfe der PCR-Methode wurde unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide H3 und H4, ausgehend von der Arnt-cDNA-Matrix (SEQ ID NO:5), die codierende Sequenz des Arnt-Rezeptors (SEQ ID NO:6) amplifiziert. Die synthetischen Oligonukleotide wurden so konstruiert, daß in das amplifizierte Arnt-Fragment am 3'- und 5'-Ende BamHI Schnittstellen eingeführt wurden. Das gereinigte PCR-Arnt-Fragment wurde einem BamHI-Restriktionsverdau unterworfen und in den ebenfalls mit BamHI geschnittenen pGBT9-Vektor ligiert (Fig. 2(A)). Die nach Transformation in den E. coli Stamm MC41rF' erhaltenen Klone (Selektion auf Amp-Resistenz) wurden hinsichtlich ihrer Plasmide untersucht. Anhand eines EcoRI Restriktionsverdaus konnte bestimmt werden, welche Bakterienklone das gewünschte Konstrukt pGBT9-Arnt enthielten. Der entsprechende Bakterienklon wurde vermehrt und die Plasmid-pGBT9-Arnt-DNA isoliert. Für die Plasmid-Isolierung aus transformierten E.coli Zellen wurde der QIAGEN-Plasmid-Kit in Kombination mit QIAGEN-Tip-200 Säulen verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmidisolierung wurde eine 150 ml Übernachtkultur der transformierten E.coli Zellen verwendet. Die Plasmidausbeute einer Isolierung lag für pGBT9-Arnt zwischen 0,5 und 1 mg/ml.

1.3 Transformation der Plasmide pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt in dem Hefestamm SFY526

1.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

20 ml YPD Medium wurden mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die 25 20 ml Übernachtkultur sollte nach dieser Zeit die stationäre Phase erreicht haben, d. h. eine OD > 1,5 zeigen. Die Übernachtkultur wurde verwendet, um 300 ml frisches YPD Medium anzimpfen; diese 300 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,3 wurde 3 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in 50 ml steriles, bidestilliertem Wasser zweimal gewaschen und in 1,5 ml frischem, steriles 1 × TE/LiAC-Puffer (unmittelbar vor Verwendung hergestellt aus 10 × TE-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) und 10 × LiAC-Puffer (1 M Lithiumacetat, pH 7,5)) resuspendiert. Die kompetenten Hefezellen wurden sofort für die Transformation verwendet.

1.3.2 Transformation kompetenter Hefezellen

35 Zu 0,1 µg Plasmid-DNA und 100 µg Carrier DNA ("herring testes carrier DNA") wurden 0,1 ml kompetente Hefezellen pipettiert sowie 0,6 ml PEG/LiAc Lösung (40% PEG 4000, 1 × TE, 1 × LiAC, frisch hergestellt). Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 30°C 30 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 70 µl DMSO folgte ein 15 min Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert. 0,25 ml der transformierten Zellen wurden auf SD-Platten (-Leu, -Trp) ausplattiert und die Platten 2 – 4 Tage bei 30°C inkubiert, bis sich die ersten Kolonien zeigten.

1.3.3 Cotransformationen

Zusätzlich zur Cotransformation mit den Plasmiden pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt wurden als negative bzw. 45 positive Kontrollen folgende Plasmidkombinationen ebenfalls in SFY526 transformiert.

- a) pGAD424/pGBT9-Arnt
- b) pGAD424-Ah/pGBT9
- c) pLAM 5'/pTD1
- d) pLAM 5'/pCL1

50 pLAM 5' kodiert für ein Hybrid aus GAL4 Bindungsdomäne und humanem Lamin C;
pTD1 kodiert für ein Hybrid aus GAL4 Aktivatordomäne und SV40 large T-Antigen;
pCL1 kodiert für ein full-length GAL4.

55 Die Plasmide pLAM5', pTD1 und pCL1 sind ebenfalls von der Fa. Clontech Laboratories Inc. erhältlich.

1.4 Dioxin-Nachweis durch Bestimmung der Interaktion des Gal4-DNA-Bindungsdomäne/Arnt-Fusionsproteins (kodiert von pGBT9-Arnt) mit dem Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne/Ah-Fusionsprotein (kodiert von pGAD424-Ah)

1.4.1 Nachweis auf Agarplatten

Die erfolgreich transformierten SFY 526 Hefen wurden auf SSX-Indikator-Platten ausgestrichen.

Die SSX-Indikator-Platten (Chien et al. 1991) weisen folgende Zusammensetzung auf:

65 Yeast-Nitrogen-Base: 6,7 g
Agar: 14 g
1 M NaPi pH 7,0: 100 ml
10 x Aminosäuren (-Leu-Trp): 100 ml

20% Sucrose: 100 ml

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal): 40 mgH₂O bidest.: ad 1 l

Die SSX Platten enthalten die Substanz X-Gal, welche nach Interaktion der Fusionsproteine zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Während die Kontroll-Hefen (pLAM5'/pcL1) nach Wachstum (o/n) auf SSX Platten eine eindeutige Blaufärbung zeigten, war dies bei den anderen Plasmidkombinationen nicht der Fall.

Die pGAD424-Ah/pGBT9-Arnt SFY5426 Hefen ließen nach Auflegen von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) enthaltenden Pads (TCDD wurde in 10% DMSO auf die Pads aufgetragen) auf die SSX-Platten eine spezifische, konzentrationsabhängige Blaufärbung im Bereich der Kontaktflächen erkennen, nicht jedoch die Kontroll-Hefen (pGAD424/pGBT9-Arnt; pGAD424-Ah/pGBT9, pLAM 5'/pTD1). Die Nachweisgrenze für 2,3,7,8-TCDD lag im Bereich von 0,1 ng pro Pad.

1.4.2 Nachweis in Flüssigkultur

Die Effektorwirkung des Dioxinliganden auf die Interaktion von Ah- und Arnt-Protein konnte auch mit Hilfe des β -Galaktosidase-Aktivitätstests in Flüssigkultur nachgewiesen werden. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Der mit pGAD424-Ah und pGBT9-Arnt cotransformierte Hefestamm SFY526 wurde über Nacht bei 30°C in SD-Medium -Leu, -Trp kultiviert. Als Kontrolle dienten die unter 1.3.3 genannten Cotransformationen a) bis d).

Jeweils 2 ml der Übernachtkultur wurden in 8 ml YPD Flüssigmedium (20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefeextrakt) pipettiert und 3–5 Stunden bei 30°C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5–0,7 aufwies. 1,5 ml der Kultur wurden im folgenden mit verschiedenen Dioxinmengen bei 30°C 3 Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert in 1,5 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O, 5,5 g/l NaH₂PO₄ · H₂O, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄ · 7H₂O, pH 7,0) gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 0,3 ml Z-Puffer Endvolumen aufgenommen. 0,1 ml dieser Zellsuspension wurden für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest verwendet. Die Zellsuspension wurde zu diesem Zweck in Trockeneis schockgefroren und sofort auf 37°C wieder aufgetaut. Zu der Zellsuspension wurden anschließend 0,7 ml Z-Puffer pipettiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 ml ONPG-Lösung (4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in Z-Puffer) gestartet. Die Freisetzung von ONP ist im Bereich von 50 bis 500 fg 2,3,7,8-TCDD konzentrationsabhängig. Der Flüssigkeitstest erwies sich als sehr sensitiv für den Nachweis des Dioxinliganden. In den Kontrollen, die ohne Dioxin inkubiert worden waren (nur mit dem Lösungsmittel 5% DMSO), war keine Aktivität des Reporterproteins β -Gal zu beobachten.

Bezüglich weiterer Details zur Durchführung des Two-Hybrid-Tests wird auf die Produktbeschreibung zum MATCHMAKER Two-Hybrid System der Firma Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA verwiesen.

Beispiel 2

Screening von Bodenproben auf Dioxinkontamination

3 Bodenproben, deren Dioxingehalt bereits zuvor mittels GC/MS ermittelt worden war, wurden einem Screeningtest nach dem beschriebenen Verfahren unterworfen. Probe 1 hatte einen PCDD/PCDF-Gehalt von 25 ng I-TEQ/kg, Probe 2 von 457 ng I-TEQ/kg und Probe 3 von 1950 ng I-TEQ/kg. Jeweils 1 g der Probe wurde mit 2 ml Benzol 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde mit 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure bei 70°C 10 min behandelt. Der klare Überstand wurde in ein Probengläschen mit 100 mg K₂CO₃ transferiert, geschüttelt und in ein weiteres Probengläschen überführt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der "Rückstand" in 300 µl Hexan aufgenommen. Die Probe wurde in 3 Aliquote aufgeteilt, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in den 3 Gläschchen mit 10 µl, 30 µl und 100 µl 5% DMSO in Wasser aufgenommen. 5 µl der jeweiligen Probe wurde in den oben unter 1.4.2 beschriebenen Test in Flüssigkultur eingeschleust.

Die erhaltenen Gelbfärbungen waren proportional zu den zuvor bestimmten I-TEQ-Werten. Allerdings wurde bei den beiden Proben mit der höchsten Konzentration ein Inhibitionseffekt beobachtet. In der Praxis ist deshalb eine noch stärkere Abstufung der Konzentrationen für die einzelnen Aliquote einer Probe erforderlich, damit man stets in einem Bereich bleibt, in dem keine Inhibition erfolgt.

55

60

65

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5
(i) ANMELDER:
(A) NAME: Hanspaul Hagenmaier
10 (B) STRASSE: Liegnitzerstr. 8
(C) ORT: Tuebingen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 72072
15
(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis fuer Effektoren
intra- und/oder interzellulaerer Protein-Protein-Wechselwirkungen
20
(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
25
(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
30 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

35
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
40 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
45
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
Oligonucleotid"
50

55

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGGTCGACAC TCTGCACCTT GCTTAGGAAT

30

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
oligonukleotid"

20

25

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

35

AGGTCGACTT ATGAGGCAGCG GCGCCAACAT

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

45

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

55

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
oligonucleotid"

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: ..

5 CGGGATCCCC GAAATGACAT CAGATGT

27

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

25 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisches
oligonucleotid"

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

35 CGGGATCCAC CTGCTGGGCA GAAAAG

26

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2616 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

55 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

60 (iv) ANTISENSE: NEIN

65 (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) GEWEBETYP: Liver
 (G) ZELLTYP: Hepatocyte
 (H) ZELLINIE: HepG2

5

(viii) POSITION IM GENOM:
 (B) KARTENPOSITION: 1p36-q12

10

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: terminator
 (B) LAGE: 2424..2426

15

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE: 1..56

20

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 57..2423

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

30

ATGGCGGCTC CTCCCACTGG GGGGGGGGTG GCGCGGCCGGC GGTGGCATCT GCGGCC

56

35

ATG GCG GCG ACT ACT GCC AAC CCC GAA ATG ACA TCA GAT GTA CCA TCA
 Met Ala Ala Thr Thr Ala Asn Pro Glu Met Thr Ser Asp Val Pro Ser
 1 5 10 15

104

40

CTG GGT CCA GCC ATT GCC TCT GGA AAC TCT GGA CCT GGA ATT CAA GGT
 Leu Gly Pro Ala Ile Ala Ser Gly Asn Ser Gly Pro Gly Ile Gln Gly
 20 25 30

152

45

GGA GGA GCC ATT GTC CAG AGG GCT ATT AAG CGG CGA CCA GGG CTG GAT
 Gly Gly Ala Ile Val Gln Arg Ala Ile Lys Arg Arg Pro Gly Leu Asp
 35 40 45

200

50

TTT GAT GAT GAT GGA GAA GGG AAC AGT AAA TTT TTG AGG TGT GAT GAT

248

55

60

65

DE 196 28 894 A1

Phe Asp Asp Asp Gly Glu Gly Asn Ser Lys Phe Leu Arg Cys Asp Asp
50 55 60

5 GAT CAG ATG TCT AAC GAT AAG GAG CGG TTT GCC AGG TCG GAT GAT GAG 296
Asp Gln Met Ser Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ala Arg Ser Asp Asp Glu
65 70 75 80

10 CAG AGC TCT GCG GAT AAA GAG AGA CTT GCC AGG GAA AAT CAC AGT GAA 344
Gln Ser Ser Ala Asp Lys Glu Arg Leu Ala Arg Glu Asn His Ser Glu
85 90 95

15 ATT GAA CGG CGG CGA CGG AAC AAG ATG ACA GCC TAC ATC ACA GAA CTG 392
Ile Glu Arg Arg Arg Asn Lys Met Thr Ala Tyr Ile Thr Glu Leu
20 100 105 110

25 TCA GAT ATG GTA CCC ACC TGT AGT GCC CTG GCT CGA AAA CCA GAC AAG 440
Ser Asp Met Val Pro Thr Cys Ser Ala Leu Ala Arg Lys Pro Asp Lys
115 120 125

30 CTA ACC ATC TTA CGC ATG GCA GTT TCT CAC ATG AAG TCC TTG CGG GGA 488
Leu Thr Ile Leu Arg Met Ala Val Ser His Met Lys Ser Leu Arg Gly
130 135 140

35 ACT GGC AAC ACA TCC ACT GAT GGC TCC TAT AAG CCG TCT TTC CTC ACT 536
Thr Gly Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Tyr Lys Pro Ser Phe Leu Thr
145 150 155 160

40 GAT CAG GAA CTG AAA CAT TTG ATC TTG GAG GCA GCA GAT GGC TTT CTG 584
Asp Gln Glu Leu Lys His Leu Ile Leu Glu Ala Ala Asp Gly Phe Leu
165 170 175

45 TTT ATT GTC TCA TGT GAG ACA GGC AGG GTG GTG TAT GTG TCT GAC TCC 632
Phe Ile Val Ser Cys Glu Thr Gly Arg Val Val Tyr Val Ser Asp Ser
180 185 190

50 GTG ACT CCT GTT TTG AAC CAG CCA CAG TCT GAA TGG TTT GGC AGC ACA 680
Val Thr Pro Val Leu Asn Gln Pro Gln Ser Glu Trp Phe Gly Ser Thr
195 200 205

55

60

65

DE 196 28 894 A1

| | |
|---|------|
| CTC TAT GAT CAG GTG CAC CCA GAT GAT GTG GAT AAA CTT CGT GAG CAG | 728 |
| Leu Tyr Asp Gln Val His Pro Asp Asp Val Asp Lys Leu Arg Glu Gln | |
| 210 215 220 | 5 |
| CTT TCC ACT TCA GAA AAT GCC CTG ACA GGG CGT ATC CTG GAT CTA AAG | 776 |
| Leu Ser Thr Ser Glu Asn Ala Leu Thr Gly Arg Ile Leu Asp Leu Lys | |
| 225 230 235 240 | 10 |
| ACT GGA ACA GTG AAA AAG GAA GGT CAG CAG TCT TCC ATG AGA ATG TGT | 824 |
| Thr Gly Thr Val Lys Lys Glu Gly Gln Gln Ser Ser Met Arg Met Cys | |
| 245 250 255 | 15 |
| ATG GGC TCA AGG AGA TCG TTT ATT TGC CGA ATG AGG TGT GGC AGT AGC | 872 |
| Met Gly Ser Arg Arg Ser Phe Ile Cys Arg Met Arg Cys Gly Ser Ser | |
| 260 265 270 | 20 |
| TCT GTG GAC CCA GTT TCT GTG AAT AGG CTG AGC TTT GTG AGG AAC AGA | 920 |
| Ser Val Asp Pro Val Ser Val Asn Arg Leu Ser Phe Val Arg Asn Arg | |
| 275 280 285 | 25 |
| TGC AGG AAT GGA CTT GGC TCT GTA AAG GAT GGG GAA CCT CAC TTC GTG | 968 |
| Cys Arg Asn Gly Leu Gly Ser Val Lys Asp Gly Glu Pro His Phe Val | |
| 290 295 300 | 30 |
| GTC GTC CAC TGC ACA GGC TAC ATC AAG GCC TGG CCC CCA GCA GGT GTT | 1016 |
| Val Val His Cys Thr Gly Tyr Ile Lys Ala Trp Pro Pro Ala Gly Val | |
| 305 310 315 320 | 35 |
| TCC CTC CCA GAT GAT GAC CCA GAG GCT GGC CAG GGA AGC AAG TTT TGC | 1064 |
| Ser Leu Pro Asp Asp Asp Pro Glu Ala Gly Gln Gly Ser Lys Phe Cys | |
| 325 330 335 | 40 |
| CTA GTG GCC ATT GGC AGA TTG CAG GTA ACT AGT TCT CCC AAC TGT ACA | 1112 |
| Leu Val Ala Ile Gly Arg Leu Gln Val Thr Ser Ser Pro Asn Cys Thr | |
| 340 345 350 | 45 |
| GAC ATG AGT AAT GTT TGT CAA CCA ACA GAG TTC ATC TCC CGA CAC AAC | 1160 |
| Asp Met Ser Asn Val Cys Gln Pro Thr Glu Phe Ile Ser Arg His Asn | |
| 355 360 365 | 50 |
| | 55 |
| | 60 |
| | 65 |

DE 196 28 894 A1

| | | | | |
|--|-----|-----|-----|------|
| ATT GAG GGT ATC TTC ACT TTT GTG GAT CAC CGC TGT GTG GCT ACT GTT Ile Glu Gly Ile Phe Thr Phe Val Asp His Arg Cys Val Ala Thr Val | 370 | 375 | 380 | 1208 |
| 5 | | | | |
| GGC TAC CAG CCA CAG GAA CTC TTA GGA AAG AAT ATT GTA GAA TTC TGT Gly Tyr Gln Pro Gln Glu Leu Leu Gly Lys Asn Ile Val Glu Phe Cys | 385 | 390 | 395 | 400 |
| 10 | | | | 1256 |
| CAT CCT GAA GAC CAG CAG CTT CTA AGA GAC AGC TTC CAA CAG GTA GTG His Pro Glu Asp Gln Gln Leu Leu Arg Asp Ser Phe Gln Gln Val Val | 405 | 410 | 415 | 1304 |
| 15 | | | | |
| AAA TTA AAA GGC CAA GTG CTG TCT GTC ATG TTC CGG TTC CGG TCT AAG Lys Leu Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Met Phe Arg Phe Arg Ser Lys | 420 | 425 | 430 | 1352 |
| 20 | | | | |
| AAC CAA GAA TGG CTC TGG ATG AGA ACC AGC TCC TTT ACT TTC CAG AAC Asn Gln Glu Trp Leu Trp Met Arg Thr Ser Ser Phe Thr Phe Gln Asn | 435 | 440 | 445 | 1400 |
| 25 | | | | |
| CCT TAC TCA GAT GAA ATT GAG TAC ATC ATC TGT ACC AAC ACC AAT GTG Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Ile Cys Thr Asn Thr Asn Val | 450 | 455 | 460 | 1448 |
| 30 | | | | |
| AAG AAC TCT AGC CAA GAA CCA CGG CCT ACA CTC TCC AAC ACA ATC CAG Lys Asn Ser Ser Gln Glu Pro Arg Pro Thr Leu Ser Asn Thr Ile Gln | 465 | 470 | 475 | 480 |
| 35 | | | | 1496 |
| AGG CCA CAA CTA GGT CCC ACA GCT AAT TTA CCC CTG GAG ATG GGC TCA Arg Pro Gln Leu Gly Pro Thr Ala Asn Leu Pro Leu Glu Met Gly Ser | 485 | 490 | 495 | 1544 |
| 40 | | | | |
| GGA CAG CTG GCA CCC AGG CAG CAA CAG CAA ACA GAA TTG GAC ATG Gly Gln Leu Ala Pro Arg Gln Gln Gln Gln Thr Glu Leu Asp Met | 500 | 505 | 510 | 1592 |
| 45 | | | | |
| 50 | | | | |
| 55 | | | | |
| 60 | | | | |
| 65 | | | | |

DE 196 28 894 A1

| | | | |
|---|-----|------|----|
| GTA CCA GGA AGA GAT GGA CTG GCC AGC TAC AAT CAT TCC CAG GTG GTT | | 1640 | |
| Val Pro Gly Arg Asp Gly Leu Ala Ser Tyr Asn His Ser Gln Val Val | | | |
| 515 | 520 | 525 | 5 |
| CAG CCT GTG ACA ACC ACA GGA CCA GAA CAC AGC AAG CCC CTT GAG AAG | | 1688 | |
| Gln Pro Val Thr Thr Gly Pro Glu His Ser Lys Pro Leu Glu Lys | | | |
| 530 | 535 | 540 | 10 |
| TCA GAT GGT TTA TTT GCC CAG GAT AGA GAT CCA AGA TTT TCA GAA ATC | | 1736 | |
| Ser Asp Gly Leu Phe Ala Gln Asp Arg Asp Pro Arg Phe Ser Glu Ile | | | |
| 545 | 550 | 555 | 15 |
| 555 | 560 | | |
| TAT CAC AAC ATC AAT GCG GAT CAG AGT AAA GGC ATC TCC TCC AGC ACT | | 1784 | |
| Tyr His Asn Ile Asn Ala Asp Gln Ser Lys Gly Ile Ser Ser Ser Thr | | | |
| 565 | 570 | 575 | 20 |
| GTC CCT GCC ACC CAA CAG CTA TTC TCC CAG GGC AAC ACA TTC CCT CCT | | 1832 | |
| Val Pro Ala Thr Gln Gln Leu Phe Ser Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro | | | |
| 580 | 585 | 590 | 25 |
| 590 | | | |
| ACC CCC CGG CCG GCA GAG AAT TTC AGG AAT AGT GGC CTA GCC CCT CCT | | 1880 | |
| Thr Pro Arg Pro Ala Glu Asn Phe Arg Asn Ser Gly Leu Ala Pro Pro | | | |
| 595 | 600 | 605 | 30 |
| 605 | | | |
| GTA ACC ATT GTC CAG CCA TCA GCT TCT GCA GGA CAG ATG TTG GCC CAG | | 1928 | |
| Val Thr Ile Val Gln Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Met Leu Ala Gln | | | |
| 610 | 615 | 620 | 35 |
| 620 | | | |
| ATT TCC CGC CAC TCC AAC CCC ACC CAA GGA GCA ACC CCA ACT TGG ACC | | 1976 | |
| Ile Ser Arg His Ser Asn Pro Thr Gln Gly Ala Thr Pro Thr Trp Thr | | | |
| 625 | 630 | 635 | 40 |
| 640 | | | |
| CCT ACT ACC CGC TCA GGC TTT TCT GCC CAG CAG GTG GCT ACC CAG GCT | | 2024 | |
| Pro Thr Thr Arg Ser Gly Phe Ser Ala Gln Gln Val Ala Thr Gln Ala | | | |
| 645 | 650 | 655 | 45 |
| 655 | | | |
| ACT GCT AAG ACT CGT ACT TCC CAG TTT GGT GTG GGC AGC TTT CAG ACT | | 2072 | |
| Thr Ala Lys Thr Arg Thr Ser Gln Phe Gly Val Gly Ser Phe Gln Thr | | | |
| 660 | 665 | 670 | 50 |
| 670 | | | |
| | | | 55 |
| | | | 60 |
| | | | 65 |

DE 196 28 894 A1

| | |
|---|------|
| CCA TCC TCC TTC AGC TCC ATG TCC CTC CCT GGT GCC CCA ACT GCA TCG Pro Ser Ser Phe Ser Ser Met Ser Leu Pro Gly Ala Pro Thr Ala Ser 675 680 685 | 2120 |
| 5 | |
| CCT GGT GCT GCT GCC TAC CCT AGT CTC ACC AAT CGT GGA TCT AAC TTT Pr Gly Ala Ala Ala Tyr Pro Ser Leu Thr Asn Arg Gly Ser Asn Phe 690 695 700 | 2168 |
| 10 | |
| GCT CCT GAG ACT GGA CAG ACT GCA GGA CAA TTC CAG ACA CGG ACA GCA Ala Pro Glu Thr Gly Gln Thr Ala Gly Gln Phe Gln Thr Arg Thr Ala 705 710 715 720 | 2216 |
| 15 | |
| GAG GGT GTG GGT GTC TGG CCA CAG TGG CAG GGC CAG CAG CCT CAT CAT Glu Gly Val Gly Val Trp Pro Gln Trp Gln Gly Gln Gln Pro His His 725 730 735 | 2264 |
| 20 | |
| CGT TCA AGT TCT AGT GAG CAA CAT GTT CAA CAA CCG CCA GCA CAG CAA Arg Ser Ser Ser Glu Gln His Val Gln Gln Pro Pro Ala Gln Gln 740 745 750 | 2312 |
| 25 | |
| CCT GGC CAG CCT GAG GTC TTC CAG GAG ATG CTG TCC ATG CTG GGA GAT Pro Gly Gln Pro Glu Val Phe Gln Glu Met Leu Ser Met Leu Gly Asp 755 760 765 | 2360 |
| 30 | |
| CAG AGC AAC AGC TAC AAC AAT GAA GAA TTC CCT GAT CTA ACT ATG TTT Gln Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Glu Glu Phe Pro Asp Leu Thr Met Phe 770 775 780 | 2408 |
| 35 | |
| CCC CCC TTT TCA GAA TAGAACTATT GGGGTGAGGA TAAGGGGTGG GGGAGAAAAA Pro Pro Phe Ser Glu 785 | 2463 |
| 40 | |
| ATCACTGTTT GTTTTTAAAAA AGCAAATCTT TCTGTAAACA GAATAAAAGT TCCTCTCCCT | 2523 |
| 45 | |
| TCCCTTCCCT CACCCCTGAC ATGTACCCCC TTTCCCTCT GGCTGTTCCC CTGCTCTGTT 50 | 2583 |
| 55 | |
| GCCTCCTAAG GTAACATTTA TAAAAAAAAAAA AAA | 2616 |
| 60 | |
| 65 | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 789 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

| | |
|---|----|
| Met Ala Ala Thr Thr Ala Asn Pro Glu Met Thr Ser Asp Val Pro Ser | 15 |
| 1 5 10 15 | |

| | |
|--|----|
| Leu Gly Pro Ala Ile Ala Ser Gly Asn Ser Gly Pro Gly Ile Gln Gly | 20 |
| 20 25 30 | |

| | |
|--|----|
| Gly Gly Ala Ile Val Gln Arg Ala Ile Lys Arg Arg Pro Gly Leu Asp. | 25 |
| 35 40 45 | |

| | |
|--|----|
| Phe Asp Asp Asp Gly Glu Gly Asn Ser Lys Phe Leu Arg Cys Asp Asp | 30 |
| 50 55 60 | |

| | |
|---|----|
| Asp Gln Met Ser Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ala Arg Ser Asp Asp Glu | 35 |
| 65 70 75 80 | |

| | |
|--|----|
| Gln Ser Ser Ala Asp Lys Glu Arg Leu Ala Arg Glu Asn His Ser Glu | 40 |
| 85 90 95 | |

| | |
|--|----|
| Ile Glu Arg Arg Arg Asn Lys Met Thr Ala Tyr Ile Thr Glu Leu | 45 |
| 100 105 110 | |

| | |
|--|----|
| Ser Asp Met Val Pro Thr Cys Ser Ala Leu Ala Arg Lys Pro Asp Lys | 50 |
| 115 120 125 | |

| | |
|--|----|
| Leu Thr Ile Leu Arg Met Ala Val Ser His Met Lys Ser Leu Arg Gly | 55 |
| 130 135 140 | |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 196 28 894 A1

Thr Gly Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Tyr Lys Pro Ser Phe Leu Thr
145 150 155 160

5 Asp Gln Glu Leu Lys His Leu Ile Leu Glu Ala Ala Asp Gly Phe Leu
165 170 175

10 Phe Ile Val Ser Cys Glu Thr Gly Arg Val Val Tyr Val Ser Asp Ser
180 185 190

15 Val Thr Pro Val Leu Asn Gln Pro Gln Ser Glu Trp Phe Gly Ser Thr
195 200 205

20 Leu Tyr Asp Gln Val His Pro Asp Asp Val Asp Lys Leu Arg Glu Gln
210 215 220

25 Leu Ser Thr Ser Glu Asn Ala Leu Thr Gly Arg Ile Leu Asp Leu Lys
225 230 235 240

30 Thr Gly Thr Val Lys Lys Glu Gly Gln Gln Ser Ser Met Arg Met Cys
245 250 255

35 Met Gly Ser Arg Arg Ser Phe Ile Cys Arg Met Arg Cys Gly Ser Ser
260 265 270

40 Ser Val Asp Pro Val Ser Val Asn Arg Leu Ser Phe Val Arg Asn Arg
275 280 285

45 Cys Arg Asn Gly Leu Gly Ser Val Lys Asp Gly Glu Pro His Phe Val
290 295 300

50 Val Val His Cys Thr Gly Tyr Ile Lys Ala Trp Pro Pro Ala Gly Val
305 310 315 320

55 Ser Leu Pro Asp Asp Asp Pro Glu Ala Gly Gln Gly Ser Lys Phe Cys
325 330 335

60

65

DE 196 28 894 A1

Leu Val Ala Ile Gly Arg Leu Gln Val Thr Ser Ser Pro Asn Cys Thr
340 345 350

Asp Met Ser Asn Val Cys Gln Pro Thr Glu Phe Ile Ser Arg His Asn
355 360 365

Ile Glu Gly Ile Phe Thr Phe Val Asp His Arg Cys Val Ala Thr Val
370 375 380

Gly Tyr Gln Pro Gln Glu Leu Leu Gly Lys Asn Ile Val Glu Phe Cys
385 390 395 400

His Pro Glu Asp Gln Gln Leu Leu Arg Asp Ser Phe Gln Gln Val Val
405 410 415

Lys Leu Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Met Phe Arg Phe Arg Ser Lys
420 425 430

Asn Gln Glu Trp Leu Trp Met Arg Thr Ser Ser Phe Thr Phe Gln Asn
435 440 445

Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Ile Cys Thr Asn Thr Asn Val
450 455 460

Lys Asn Ser Ser Gln Glu Pro Arg Pro Thr Leu Ser Asn Thr Ile Gln
465 470 475 480

Arg Pro Gln Leu Gly Pro Thr Ala Asn Leu Pro Leu Glu Met Gly Ser
485 490 495

Gly Gln Leu Ala Pro Arg Gln Gln Gln Gln Thr Glu Leu Asp Met
500 505 510

Val Pro Gly Arg Asp Gly Leu Ala Ser Tyr Asn His Ser Gln Val Val
515 520 525

Gln Pro Val Thr Thr Gly Pro Glu His Ser Lys Pro Leu Glu Lys
530 535 540

65

Ser Asp Gly Leu Phe Ala Gln Asp Arg Asp Pro Arg Phe Ser Glu Ile
 545 550 555 560

Tyr His Asn Ile Asn Ala Asp Gln Ser Lys Gly Ile Ser Ser Ser Thr
 565 570 575

Val Pro Ala Thr Gln Gln Leu Phe Ser Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro
 580 585 590

Thr Pro Arg Pro Ala Glu Asn Phe Arg Asn Ser Gly Leu Ala Pro Pro
 595 600 605

Val Thr Ile Val Gln Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Met Leu Ala Gln
 610 615 620

Ile Ser Arg His Ser Asn Pro Thr Gln Gly Ala Thr Pro Thr Trp Thr
 625 630 635 640

Pro Thr Thr Arg Ser Gly Phe Ser Ala Gln Gln Val Ala Thr Gln Ala
 645 650 655

Thr Ala Lys Thr Arg Thr Ser Gln Phe Gly Val Gly Ser Phe Gln Thr
 660 665 670

Pro Ser Ser Phe Ser Ser Met Ser Leu Pro Gly Ala Pro Thr Ala Ser
 675 680 685

Pro Gly Ala Ala Ala Tyr Pro Ser Leu Thr Asn Arg Gly Ser Asn Phe
 690 695 700

Ala Pro Glu Thr Gly Gln Thr Ala Gly Gln Phe Gln Thr Arg Thr Ala
 705 710 715 720

Glu Gly Val Gly Val Trp Pro Gln Trp Gln Gly Gln Gln Pro His His
 725 730 735

Arg Ser Ser Ser Ser Glu Gln His Val Gln Gln Pro Pro Ala Gln Gln
 740 745 750

Pro Gly Gln Pro Glu Val Phe Gln Glu Met Leu Ser Met Leu Gly Asp
 755 760 765

Gln Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Glu Glu Phe Pro Asp Leu Thr Met Phe
 770 775 780

Pro Pro Phe Ser Glu
 785

Patentansprüche

1. Nachweisverfahren für Effektoren intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man
 - a) in einer Wirtszelle in Gegenwart eines Analyten, in dem man die Effektorfunktion vermutet, zwei Polypeptid-Hybride A₁A₂ und B₁B₂ exprimiert, deren Domänen A₁ und B₁ zusammen einen funktionellen Transkriptionsaktivator-Komplex bilden, wenn die Domänen A₂ und B₂, welche die intra- und/oder interzelluläre Wechselwirkung imitieren, miteinander wechselwirken, wobei die Wechselwirkung zwischen den Polypeptiddomänen A₂ und B₂ nur bei Fehlen oder Vorliegen der Effektorfunktion in dem Analyten zu beobachten ist; und
 - b) auf Expression eines Reportergens analysiert, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche der funktionelle Transkriptionsaktivator-Komplex bindet, wobei Expression des Reportergen-Produkts auf Vorliegen oder Fehlen der Effektorfunktion im Analyten hinweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei man die Wirtszelle mit einer ersten und einer zweiten Nukleinsäure-Sequenz transformiert, wobei die erste Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid A₁A₂ kodiert, welches die Transkriptions-Aktivierungsdomäne A₁ des Transkriptionsaktivators und die Polypeptid-Domäne A₂ umfaßt; und die zweite Nukleinsäuresequenz für das Polypeptid-Hybrid B₁B₂ kodiert, welches die DNA-Bindungsdomäne B₁ des Transkriptionsaktivators und die Polypeptid-Domäne B₂ umfaßt.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt ausgewählt ist unter Körperfüssigkeitsproben, umweltanalytischen Proben, Reaktionsgemischen chemischer Synthesen, Lebensmittelproben, Extrakten obiger Proben, und Extrakten oder Homogenaten prokaryotischer oder eukaryotischer menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Zellen.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Analyt ein Gemisch von Substanzen oder eine Einzelsubstanz umfaßt, für die man die Effektorfunktion vermutet.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Effektor zellphysiologische Wechselwirkungen eukaryotischer oder prokaryotischer Zellen oder virale Prozesse beeinflußt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Effektor ein Schadstoff, wie insbesondere Dioxin, ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Effektor den Zusammenbau von Viruspartikeln oder die Bindung von Viruspartikeln an zelluläre Rezeptoren beeinflußt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Wirtssystem ein prokaryotisches oder eukaryotisches Wirtssystem ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei als Wirtssystem ein Hefe-Wirtsstamm, ausgewählt unter SFY526 und HF7c, verwendet wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Aktivierungs-Domäne A₁ abgeleitet ist vom Transkriptionsaktivator GAL4 aus Hefe oder VP16 aus Herpes Simplex virus.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die DNA-Bindungsdomäne B₁ abgeleitet ist vom Transkriptionsaktivator GAL4 aus Hefe oder LexA aus E. coli.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Reportergen ausgewählt ist unter lacZ aus E. coli oder HIS3 und LEU2 aus Hefe.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Hybrid A₁A₂-kodierende Nukleinsäure abgeleitet ist von Plasmid pGAD424.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Hybrid B₁B₂-kodierende Nukleinsäure abgeleitet ist von Plasmid pGBT9.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Polypeptid-Domäne A₂ ausgewählt ist unter dem Ah-Rezeptor oder einem funktionalen Äquivalent davon; und die Polypeptid-Domäne B₂ ausgewählt ist unter dem Arndt-Protein und HSP90 und den funktionalen Äquivalenten davon.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Polypeptid-Domänen A₂ und B₂ ausgewählt sind unter viralen Capsid-Proteinen und viralen Envelope-Glykoproteinen und den funktionalen Äquivalenten davon; wobei die Domänen so gewählt sind, daß sie eine intermolekulare Bindung eingehen können.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Kombinationen von A₂ und B₂ ausgewählt ist unter folgenden Polypeptid-Kombinationen VP1/VP3, VP3/VP1, p18/p18 und p24/p24.
18. Verfahren zur Isolierung eines Effektors intra- und/oder interzellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei man

5 a) einen Analyten einem Nachweisverfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 unterzieht;
 b) bei positivem Nachweis einer Effektorfunktion in dem Analyten diese mit herkömmlichen präparativen Methoden, gegebenenfalls durch weitere Auf trennung des Analyten, eingrenzt und den Effektor gegebenenfalls mit Hilfe des Nachweisverfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 lokalisiert und dann mit herkömmlichen präparativen Methoden isoliert.

10 19. Nukleinsäure-Sequenz, kodierend für ein Polypeptid-Hybrid, das Polypeptid-Domänen gemäß der Definition in einem der Ansprüche 13 und 17 umfaßt.

15 20. Nukleinsäure-Sequenz kodierend für ein Polypeptid-Hybrid ausgewählt unter GAL4-Bindungsdomäne/ Arnt und GAL4-Aktivierungsdomäne/Ah.

20 21. Analysen-Kit zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend in getrennten Kompartimenten

a) einen ersten Transformationsvektor, kodierend für eine Polypeptid-Hybrid A₁A₂,
 b) einen zweiten Transformationsvektor, kodierend für eine Polypeptid-Hybrid B₁B₂, und gegebenenfalls

c) eine Wirtszelle, enthaltend die genetische Information für ein Reportergen, das unter der genetischen Kontrolle einer stromaufwärts gelegenen Transkriptions-Aktivierungssequenz steht, an welche, nach Transformation der Wirtszelle mit dem ersten und dem zweiten Transformationsvektor, der Transkriptionsaktivator-Komplex A₁B₁ bindet, wenn die Hybridprotein-Domänen A₂ und B₂ in Gegenwart oder Abwesenheit eines Effektors miteinander wechselwirken.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

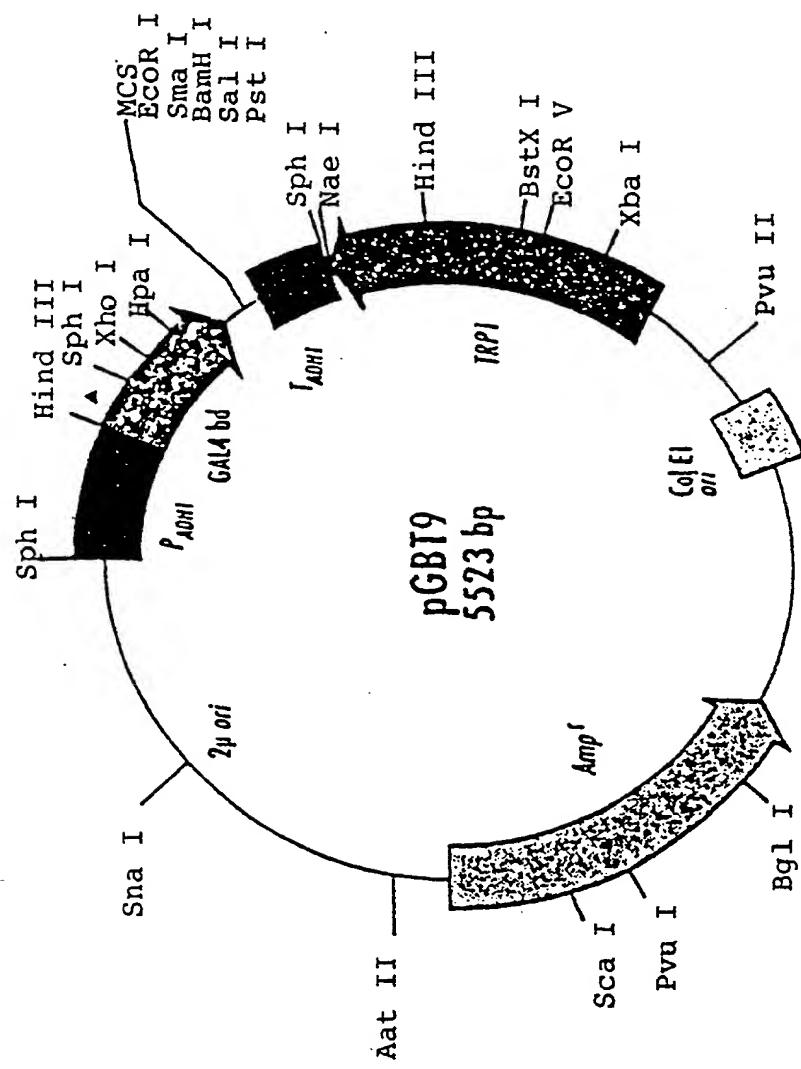


Fig. 1 (A)

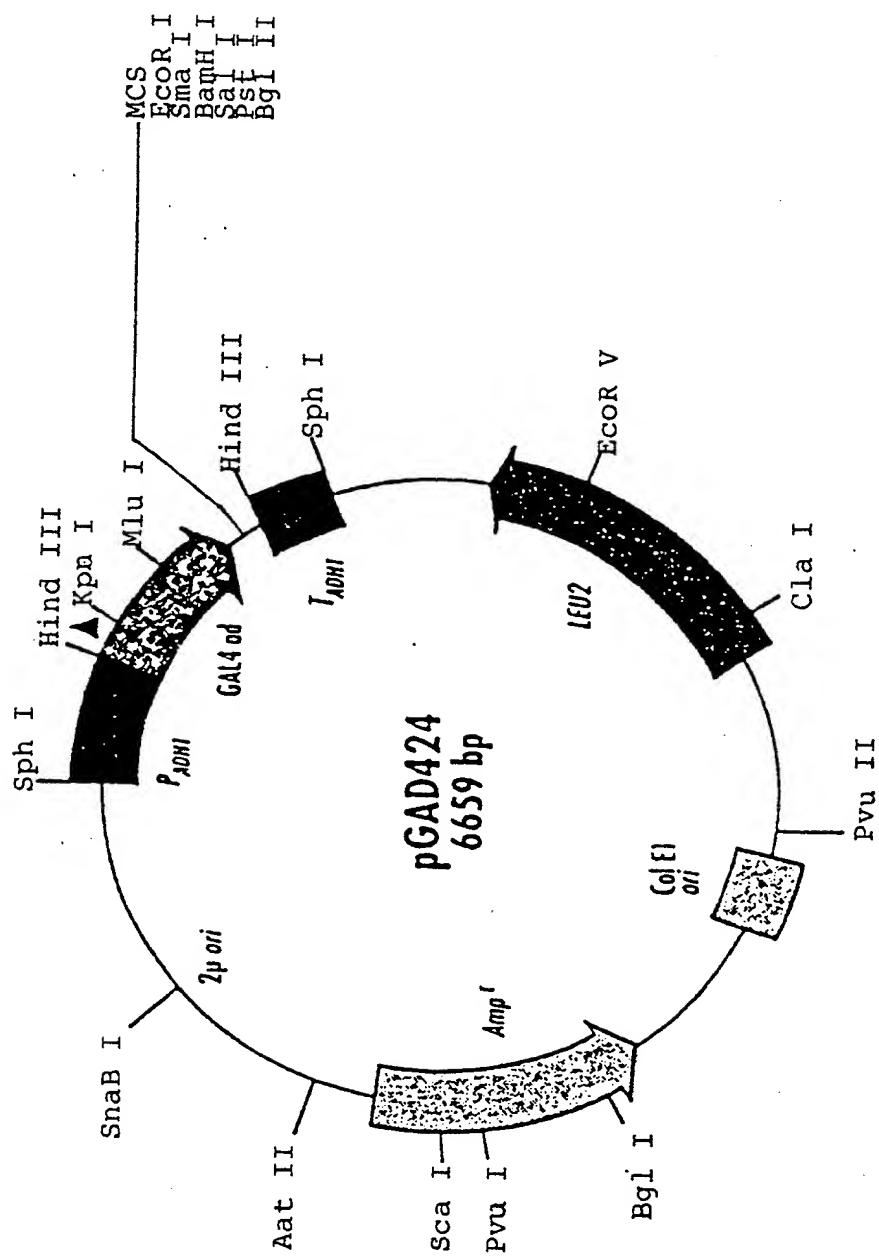


Fig. 1 (B)

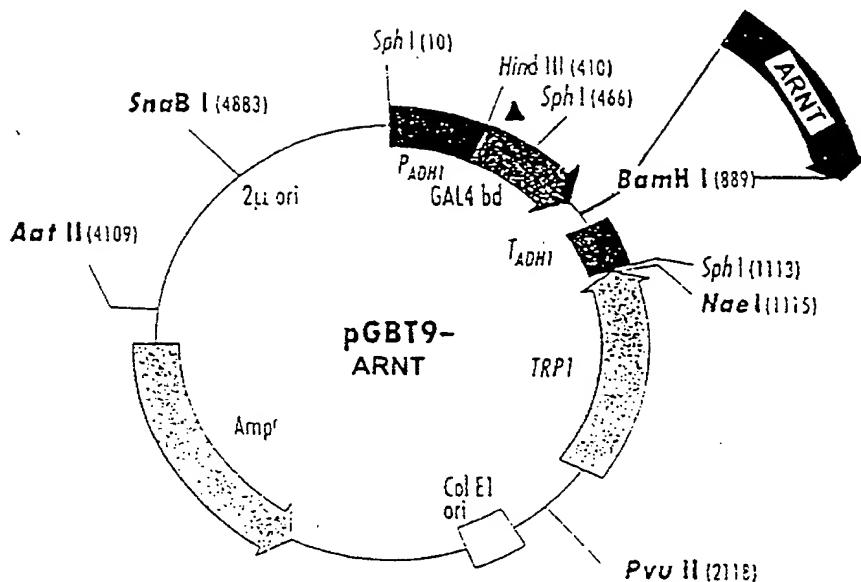


Fig. 2 (A)

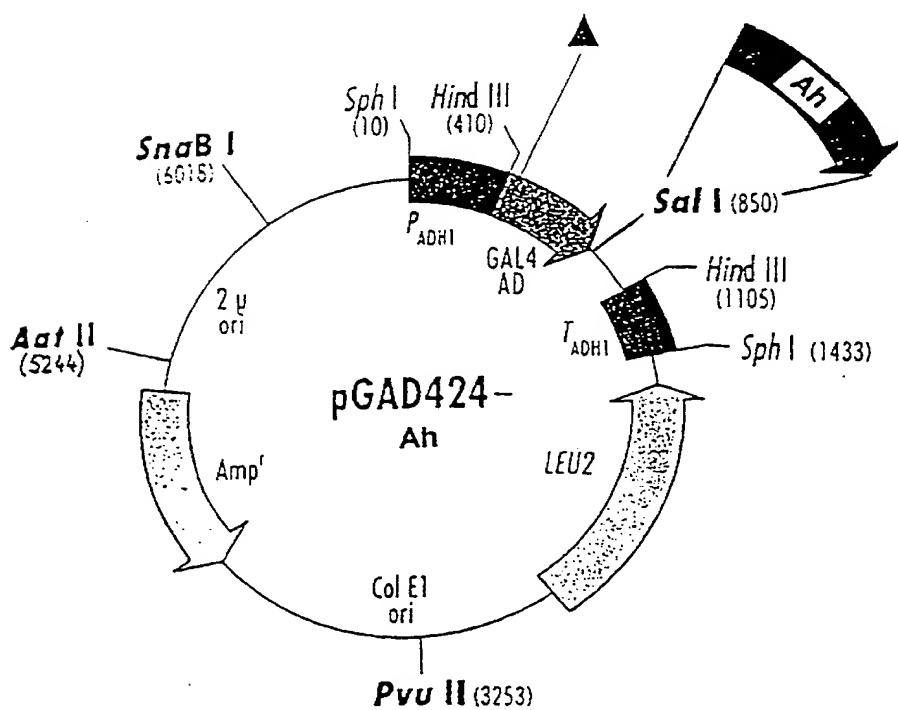


Fig. 2 (B)